

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3738982 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 38 982.3
㉔ Anmeldetag: 17. 11. 87
㉕ Offenlegungstag: 17. 11. 88

⑥ Int. Cl. 4:
G01N 33/68

G 01 N 33/53
G 01 N 33/50
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/00
// G01N 33/569

DE 3738982 A1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
30.04.87 DE 37 14 445.6 19.05.87 DE 37 16 724.3

⑦① Anmelder:
Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

⑦④ Vertreter:
Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

⑦② Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Bestimmung von Proteinen, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren aus Körperflüssigkeiten

Es wird ein Verfahren zur Bestimmung von Proteinen, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren, die aus Proben von Körperflüssigkeiten stammen, beschrieben. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Probe von einem gegebenenfalls ein mikrobizides Mittel enthaltenden, saugfähigen Träger aufgenommen wird, wobei der saugfähige Träger mit einem die Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen ist, die getrocknete Probe eluiert und dem Diagnoseverfahren zugeführt wird.

DE 3738982 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Proteinen, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren, die aus Proben von Körperflüssigkeiten stammen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Probe von einem gegebenenfalls ein mikrobizides Mittel enthaltenden, saugfähigen Träger aufgenommen wird, wobei der saugfähige Träger mit einem die Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen ist, die getrocknete Probe eluiert und dem Diagnoseverfahren zugeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der stabilisierende Zusatz im wesentlichen aus leicht wasserlöslichen, nicht hygroskopischen Zuckern oder Glycolen besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht hygroskopischen Zucker Mono-, Di- oder Oligosaccharide sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der nicht hygroskopische Zucker Saccharose ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger mit 1 bis 50 Gew.-%iger, vorzugsweise 10 bis 40 Gew.-%iger, besonders bevorzugt 20 bis 35 Gew.-%iger Lösung des Zusatzes behandelt worden ist und die gelösten Zusätze in fester Form auf dem saugfähigen Träger vorliegen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine Antikörper, Enzyme oder Strukturproteine sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeiten Blut, Urin, Liquor und/oder Sekrete sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der saugfähige Träger aus einem wäßrig benetzbaren Material besteht.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das wäßrig benetzbare Material ein poröser Filter aus Cellulosepapier oder porösem Kunststoff ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Diagnoseverfahren ein zellulärer ELISA, ein zellulärer RIA, die zelluläre Immunfluoreszenzmikroskopie, die Cytofluorimetrie, die Fluoreszenzspektralphotometrie, EIA (enzyme immuno assay) oder ein ELISA eingesetzt wird.
11. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Ansprüchen 1 bis 10, bestehend aus einem Laminat aus

- a) einer oberen hydrophoben Folie mit Aussparungen,
- b) einer unteren hydrophoben Folie mit zu den Aussparungen der oberen Folie coaxialen Aussparungen,
- c) einem dazwischen liegenden saugfähigen Material, das allseitig über die Kanten der Aussparungen der Folien herausragt, mit einem Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen ist und
- d) gegebenenfalls einer oberen und/oder unteren abziehbaren Deckfolie, die auf der oberen und/oder unteren hydrophoben Folie aufgebracht ist.

12. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Ansprüchen 1 bis 10, bestehend aus einer hydrophoben Folie mit Aussparungen, wobei die Aussparungen mit einem saugfähigen Material überklebt, mit einem Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen sind und gegebenenfalls jeweils eine abziehbare Deckfolie auf der Ober- und/oder Unterseite der hydrophoben Folie angebracht ist.
13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bestehend aus einer streifenförmigen hydrophoben Folie, auf die in Abständen Stücke aus saugfähigem Material mit einem Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufgebracht sind.
14. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Folie aus einem Papierstreifen, der mit einem Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen ist, besteht, der mit Ausnahme von Aussparungen hydrophobiert ist, oder die Aussparung durch eine hydrophobe Umrandung von der Umgebung getrennt ist.
15. Vorrichtung nach Ansprüchen 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie als lange, aufrollbare Streifen vorliegen.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Proteinen, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren, die aus Proben von Körperflüssigkeiten stammen.

Die medizinische Analytik hat ihre mit Abstand größte Bedeutung in der Analyse wäßriger Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen erreicht, wie der Blut-, Sero-, Liquor- und Urinanalytik.

Medizinische Analysen werden in der Regel an frischem Probenmaterial durchgeführt. Die forensische Medizin hingegen ist häufig auf die Analyse eingetrockneter Spuren von Körperflüssigkeiten, beispielsweise Blut, angewiesen. Aus solchen Proben können serologische Parameter nur noch in stark eingeschränktem Umfang nachgewiesen werden. Ein bekanntes Beispiel für eine solche Analytik ist die Blutgruppenzuordnung auch bei eingetrocknetem Analysematerial. Eine Haplo-Typisierung ist jedoch nicht mehr möglich. Es wäre somit in der medizinischen Analytik von größter Bedeutung, wenn Diagnose und Analyse körpereigener Proben mit getrocknetem Material möglich wären. Es sei in diesem Zusammenhang nur auf die AIDS-Serologie hingewiesen, das heißt auf den Nachweis von Antikörpern, die gegen das AIDS-Virus (HIV) gerichtet sind. Derartige AIDS-Tests werden an großen Kollektiven durchgeführt. Die Untersuchung ganzer Bevölkerungskreise wird diskutiert. Dabei ist bereits die Probenentnahme durch Punktion einer Vene problematisch, da sie nur vom Arzt durchgeführt werden darf. Anschließend müssen flüssige Blutproben oder Seren sicher versandt werden, Infolge der Bruch- und Infektionsgefahr ist eine Versendung, wenn überhaupt, nur unter erhöhtem Risiko möglich.

Des weiteren ist der Transport dieser gefährlichen infektiösen Flüssigkeiten mit hohen Kosten verbunden.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß beispielsweise Antikörper aus getrocknetem Blut eluiert werden können (H.D. Brede, 1956, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 167, 31 bis 37). In der Patentanmeldung P 37 14 445 wird

speziell für die Analytik von Anti-HIV-Antikörpern (human immune deficiency virus) ein Verfahren vorgeschlagen, um aus Trockenblut, welches auf Filterpapier fixiert ist, mit Hilfe eines Immunfluoreszenztestes die spezifischen Antikörper nachzuweisen. Das Verfahren funktioniert jedoch zufriedenstellend nur, wenn von frisch getrockneten Blutproben ausgegangen wird. Einer weiten Nutzbarmachung dieses Systems steht jedoch entgegen, daß die biologische Aktivität der Antikörper durch längere Lagerung und/oder höhere Temperatur stark beeinträchtigt wird.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen zur Bestimmung von Proteinen, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren, die aus Proben von Körperflüssigkeiten stammen, wobei die Aktivität dieser Bestandteile der Körperflüssigkeiten auch bei einer längeren Lagerung selbst bei höheren Temperaturen keine Beeinträchtigung erfährt.

Überraschenderweise wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die zu untersuchende Probe von einem gegebenenfalls ein mikrobizides Mittel enthaltenden, saugfähigen Träger aufgenommen wird, wobei der saugfähige Träger mit einem die Proteine und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz versehen ist, die getrocknete Probe eluiert und dem Diagnoseverfahren zugeführt wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besteht der Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierende Zusatz im wesentlichen aus leicht wasserlöslichen, nicht hygroskopischen Zuckern oder Glycolen. Die nicht hygroskopischen Zucker stammen vorzugsweise aus der Gruppe der Mono-, Di- oder Oligosaccharide. Als Beispiel für ein erfindungsgemäß verwendbares Disaccharid wird Saccharose genannt. Die erfindungsgemäß verwendbaren saugfähigen Träger bestehen vorzugsweise aus einem wäbzig benetzbaren Material, besonders bevorzugt aus porösen Filtern, aus Cellulosepapier oder porösem Kunststoff. Die saugfähigen Träger werden mit 1 bis 50 Gew.-%iger, vorzugsweise 10 bis 40 Gew.-%iger, besonders bevorzugt 20 bis 35 Gew.-%iger Lösung des erfindungsgemäßen Zusatzes behandelt. Nachdem die Lösung bis zur Sättigung aufgenommen worden ist, wird der saugfähige Träger getrocknet, so daß die Zusätze in fester Form auf dem saugfähigen Träger vorliegen.

Die mit der Methode bestimmbaren Proteine sind insbesondere Antikörper, Enzyme oder Strukturproteine.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Liquor und/oder Sekrete verwendet werden. Nach der Elution, die vorzugsweise nach Rekonstituierung der Probe in einer feuchten Kammer durchgeführt werden sollte, kann die zu untersuchende Probe bekannten Verfahren der klinischen Diagnostik wie zellulärem ELISA, zellulärem RIA, die zelluläre Immunfluoreszenzmikroskopie, Cytofluorimetrie, Fluoreszenzspektralphotometrie, EIA (enzyme immuno assay) oder ELISA unterworfen werden.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind folgende Mittel geeignet:

1. eine Plastikfolie mit Löchern (3 mm Durchmesser) in Objektträgermaskenformat und Filterscheibchen, zum Beispiel 3MM-Filter der Firma Whatman (Durchmesser 5 mm), die auf die Lochränder geklebt sind und einen Proteine, Protein-

strukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweisen (siehe Fig. 1a und 1b) oder

2. Filter aus steifem Papier, die einen Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweisen, zum Beispiel 3MM-Filter (Whatman) mit Objektträgerformatierung, bei der entweder die gesamte Maske plastifiziert oder hydrophob gemacht wurde oder die Filterscheibchenmarkierung mit hydrophobem, das Filter durchdringendem Druckmaterial aufgebracht wurde (siehe Fig. 2 und 3).

Es sind jedoch alle Mittel geeignet, die verhindern, daß Serumbestandteile oder Lösungen der Elutionspuffer Ursache für störende Kontaminationen sein können.

Die Abbildungen zeigen Vorrichtungen zur Aufnahme einer Blutprobe, die als Trockenblutprobe lagerfähig und ohne Kühlung transportfähig ist. Eine Blutprobe befindet sich in einer Kapillare (1). Aus der Kapillare wird eine kleine Blutmenge (2) in dafür vorgesehene Felder (3a bis c) getropft.

Die Fig. 1a und 1b zeigen eine in Querrichtung perforierte Endlosplastikfolie (4), die Aussparungen (5) aufweist, die mit saugfähigem Material, vorzugsweise Filterpapierscheibchen (6), die einen Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweisen, zugeklebt sind (Fig. 1b) und zusammen das Feld (3a) bilden. Die Aussparungen (5) werden auf die Größe der entsprechenden, bei der Analyse verwendeten Objektträgermasken abgestimmt und haben vorzugsweise einen Durchmesser von 3 mm.

Die Filterscheibchen (6) besitzen dann vorzugsweise einen Durchmesser von ca. 5 mm. Die Ober- und Unterseite der Vorrichtung kann gewünschtenfalls jeweils durch eine abziehbare Deckfolie (7) geschützt sein, welche beispielsweise in Richtung der Pfeile (8) abziehbar ist. Die Blutprobe wird auf die entsprechenden Felder (3a) getropft und dann getrocknet. Bei der später erfolgenden Analyse wird die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens direkt auf den Objektträger (9) gelegt in der Weise, daß die Vertiefungen (10) des Objektträgers mit den entsprechenden Feldern (3a) in eine coaxiale Anordnung, vorzugsweise Deckung gebracht werden. Vorher muß selbstverständlich die gegebenenfalls vorhandene abziehbare Folie (7) entfernt worden sein. Danach wird mittels eines geeigneten Puffers das Filterscheibchen eluiert.

In Abbildung 2 ist die das zur Probeaufnahme bestimmte Feld (3b) tragende Schicht vorzugsweise ein in bestimmten Abschnitte quer perforierter Endlospapierstreifen (11), der mit Ausnahme der vorzugsweise rund ausgestalteten Felder (3b) mit einem hydrophoben Material imprägniert ist, wobei das hydrophobe Material das Papier durchdringt und beide Oberflächen bedeckt. Das hydrophobe Material wird beispielsweise mittels Druckverfahren aufgebracht. Der Papierstreifen (11) kann beispielsweise aus Papier der Güte 3MM der Firma Whatman bestehen, einen Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweisen und ebenfalls mit Plastikdeckfolien geschützt werden.

Die Abbildung 3 zeigt schematisch eine weitere bevorzugte Ausgestaltung der Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die die zur Aufnahme der Blutprobe bestimmten Felder (3c) tragende Schicht ein in bestimmten Abschnitten in Querrichtung perforierter Endlospapierstreifen (12) ist, und die vorzugsweise in runder Form ausgestalteten

Felder (3c) durch eine aus hydrophobem Material bestehende Linie (13) vorzugsweise kreisförmig begrenzt sind. Das hydrophobe Material muß dabei sowohl oberflächlich auf dem Papierstreifen (12) aufgebracht sein als auch den Papierstreifen an den markierten Stellen durchdringen. Das hydrophobe Material ist vorzugsweise ein hydrophobes Druckmaterial. Die Größe der Felder (3b und 3c) sind auch bei den entsprechenden Ausführungsformen so abgestimmt, daß sie mit den Vertiefungen (10) der jeweils verwendeten Objektträger (9) zur Deckung gebracht werden können.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht aus einem Laminat aus

- a) einer oberen hydrophoben Folie mit Aussparungen,
- b) einer unteren hydrophoben Folie mit zu den Aussparungen der oberen Folie coaxialen Aussparungen,
- c) einem dazwischen liegenden saugfähigen Material, das allseitig über die Kanten der Aussparungen der Folien herausragt, einen Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweist und
- d) gegebenenfalls einer oberen und/oder unteren abziehbaren Deckfolie, die auf der oberen und/oder unteren hydrophoben Folie aufgebracht ist.

Eine weitere Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann bestehen aus einer streifenförmigen Folie, auf die in Abständen Stücke aus saugfähigem Material, das einen Protein, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz aufweist, aufgebracht sind, oder einer stäbchenförmigen Anordnung, an deren Enden sich das saugfähige Material befindet.

Die Breite der streifenförmigen Folie, die mit den Stücken eines saugfähigen Materials versehen ist, bestimmt die Anzahl der gewünschten Untersuchungen.

Die Vorrichtungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können entweder in Stücken oder als lange, aufrollbare Streifen vorliegen.

Die Abbildung 4 zeigt eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehend aus einem Plastikstreifen (14), auf den in der Nähe des einen Endes Filterpapierstücke aufgeklebt sind. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Streifen 79 mm lang, 5 mm breit und 0,1 mm dick. Das Filterpapier (15) hat dann vorzugsweise die Größe 20 mm × 5 mm × 2 mm und ist getränkt mit einer Lösung von beispielsweise 30% Saccharose und 0,1% Natriumazid. Dieser Filterstreifen ist insbesondere zur Aufnahme von Blut für die Auswertung von Trockenblutproben geeignet.

Die Abbildung 5 zeigt stark schematisiert, wie das Elutionsverfahren durchgeführt wird. Man verwendet dazu eine Schablone, vorzugsweise in Postkartenformat, die eventuell magnetisierbar ist. Die Schablone (16) weist eine größere rechteckige Aussparung (17) auf, die vorzugsweise etwas größer als ein zur Untersuchung eingesetzter Objektträger ist. Unter der Aussparung (17) sind zeilenartig untereinander in zwei Zeilen jeweils sechs quadratische Aussparungen (18) angeordnet. Das Feld mit den quadratischen Aussparungen (19) ragt nicht über die längeren Seiten der rechteckigen Aussparung (17) hinaus. Wie die Abbildung 5 (a) zeigt,

wird die Rückseite der Platte dadurch definiert, daß überlappend über das Feld mit den quadratischen Aussparungen (19) eine selbstklebende Folie befestigt wird, dergestalt, daß die klebrige Schicht zur Vorderseite der Schablone (16) zeigt.

Die Abbildung 5 (b) zeigt nun in perspektivischer Darstellung die Vorderseite der Schablone mit der Aussparung (17) und den quadratischen Aussparungen (18), die durch die selbstklebende Folie (20) verschlossen sind und kleine Vertiefungen bilden. Der Teststreifen (14) wird nun so angeordnet, daß er mit dem den saugfähigen Träger (15) tragenden Ende genau in die Aussparung (17) paßt und an seinem freien Ende mittels der Klebefolie, die den Boden der quadratischen Aussparungen (18) bildet, fixiert wird (siehe Pfeile). Der saugfähige Träger (15) weist selbstverständlich zur Rückseite der Schablone. In der Abbildung 5 (c) sind drei Teststreifen (14) gezeigt, die mit den den saugfähigen Träger tragenden Enden in die rechteckige Aussparung (17) weisen und am anderen Ende durch die Klebefolie am Boden der quadratischen Aussparung fixiert sind. Die Abbildung 5 (c) zeigt die Vorderseite der Anordnung. Die Abbildung 5 (d) zeigt die Anordnung der Abbildung 5 (c) von der Rückseite her gesehen. Die saugfähigen Träger (15) der Teststreifen (14) ragen in die Aussparung (17) hinein. Unter der rechteckigen Aussparung (17) befindet sich der nicht klebende Teil der Klebefolie (20), der das Feld mit den quadratischen Aussparungen (18) überlappend überdeckt. Die Abbildung 5 (e) zeigt wiederum von der Vorderseite eine Anordnung, in der durch parallel zur längeren Seite der Aussparung (17) angeordnete Magnetstreifen (21) eine weitere Stabilisierung der Teststreifen gegen eventuelles Verrutschen ermöglicht wird. In die rechteckige Aussparung (17) ist nun ein Objektträger (22) geschoben. Der Objektträger (22) weist in zwei Reihen je sechs Vertiefungen auf, deren Positionen mit römischen Ziffern gekennzeichnet sind.

Bevor die Proben aus dem saugfähigen Träger (15) des Teststäbchens (14) in die entsprechenden Positionen II/VIII, III/IX und IV/X eluiert werden, müssen die saugfähigen Träger (14) jeweils mit 25 µl Verdünnungspuffer beschichtet und für zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert werden (dies entspricht der Verfahrensstufe, die in Abbildung 5 (d) demonstriert ist). Danach werden Proben in die entsprechenden Vertiefungen in dem Objektträger transferiert, in dem zuvor 10 µl Verdünnungspuffer pipettiert wurden. Lediglich die Auftragsstellen I und VII erhalten je 10 µl des entsprechenden, z. B. HIV-positiven Kontrollserums.

Die Abbildung 6 demonstriert das Verhalten der relativen Fluoreszenz von Proben, die aus vorbehandelten bzw. unbehandelten saugfähigen Trägern isoliert wurden im Immunfluoreszenztest auf Anti-HIV-Antikörper. Die Proben stammten jeweils aus HIV-positivem Blut. Im einzelnen wird die zeitliche Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz von Proben, die

- a) aus unbehandeltem saugfähigen Träger (○ — ○)
- b) aus mit 30%iger Saccharose/0,1%igem Natriumazid (△ — △) behandeltem saugfähigen Träger
- c) aus nur mit 0,1%igem Natriumazid (□ — □) behandeltem saugfähigen Träger sowie
- d) aus mit 50 mM EDTA (● — ●) behandeltem saugfähigen Träger eluiert wurden,

demonstriert. Auch nach 14 Tagen hat sich die relative

Fluoreszenz der Probe, die aus mit der Zuckerlösung behandeltem saugfähigen Träger stammt, kaum verändert, während die relative Fluoreszenz der anderen Proben auf 20 bis etwas unter 40% abgesunken ist. Die Immunfluoreszenzmessung wurde jeweils gegenüber einer Kontrolle, die bei 4°C gelagert worden war, durchgeführt.

Die Verwendung eines saugfähigen Trägers, der einen Proteine, Proteinstrukturen und Nukleinsäuren stabilisierenden Zusatz enthält, ermöglicht eine exakte Erfassung von diagnostischen Parametern bei der Untersuchung von getrockneten Körperflüssigkeiten auch nach längerer Lagerzeit bei höheren Temperaturen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden Untersuchungen bestimmter Parameter getrockneter Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin, Liquor oder Sekrete, in besonders vorteilhafter Weise ermöglicht. Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens werden am Beispiel des AIDS-Tests erläutert:

Es werden Serodiagnosen zum Beispiel auf Antikörper gegen HIV, aus Trockenblut stammend, möglich, welche

- problemlos durch Hilfspersonal erfolgen können,
- wobei der Postversand sicher, billig und ohne Bruchgefahr von Gefäßen vonstatten gehen kann,
- wobei die Proben die lange Zeit des Versandweges bei auftretenden hohen Temperaturen ohne Schädigung überstehen,
- wobei das Probenmaterial in großer Stückzahl durch "Massenscreening" auch in medizinisch unterversorgten Gebieten möglich wird,
- wobei die Auswertung durch Fachpersonal in zentralen Laboreinheiten erfolgen kann und die gefährliche Selbstbeurteilung bei "dip stick"-Tests vermieden werden kann sowie
- anonyme Tests erleichtert werden.

Die nativ eluierten Proteine können mit unterschiedlichsten Meßverfahren bestimmt werden wie ELISA-Techniken, Immunfluoreszenztechniken, RIA, EIA, FIA, Western blot etc.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Zur Präparation des zur Aufnahme der Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, geeigneten Filters verwendet man eine Plastikfolie mit Löchern von 3 mm Durchmesser im Objektträgermaskenformat, wobei 3MM Filter (zum Beispiel der Fa. Whatman, Durchmesser 5 mm oder Fa. Macherey & Nagel, MN 440 oder MN 827, Durchmesser 5 mm) auf die Lochränder geklebt sind. Es können aber auch Filter aus steifem Papier zum Einsatz kommen, vorzugsweise mit Objektträgerformatierung, bei der entweder die gesamte Maske plastifiziert oder hydrophobiert wurde oder die Filterscheibchenmarkierung mit hydrophobem, das Filter durchdringendem Druckmaterial aufgebracht wurde. Als weitere bevorzugte Anwendungsform können Plastikstreifen verwendet werden, vorzugsweise aus hydrophobem Material, auf die runde oder eckige Filterpapierplättchen aufgeklebt sind. Als Filterpapier werden die oben genannten Qualitäten bevorzugt. Als besonders geeignet für eine Einzelanalyse haben sich schmale Teststreifen, wie sie in der medizinischen Diagnostik gebräuchlich sind, heraus-

gestellt. Dabei werden vorzugsweise auf einem 5 oder 6 mm breiten Plastikstreifen die eckigen, vorzugsweise quadratischen oder runden Papierfilter im Abstand der Objektträger-Lochpositionen aufgeklebt. Das Filterpapier wird vor dem Klebevorgang mit einer zuckerhaltigen Lösung getränkt. Dabei wird vorzugsweise eine 30%ige Lösung von Saccharose und 0,1% NaN_3 verwendet. Das Papier nimmt dabei in etwa die Lösungsmenge seines Eigengewichtes auf. Das entspricht ca. 15 bis 30 μl pro 5 mm \times 20 mm Filter je nach gewählter Papierqualität. Der gesättigte Filter wird sodann getrocknet und ist für den Aufklebevorgang präpariert. Soll auf dem Objektträger eine weitere Testreihe, zum Beispiel mit HIV-infizierten Zellen, installiert werden, werden auf dem Streifen entsprechend drei Filter im Lochabstand des Objektträgers aufgebracht.

Der Teststreifen wird für die Analyse mit der Filterseite so auf die Lochpositionen positioniert, daß bis zu sechs Streifen parallel über dem Zellrasen eluiert werden können. Die überstehenden Enden der Streifen stehen für Zwecke der korrekten Positionierung und einer Kodierung zur Verfügung.

Als zu untersuchendes Vollblut dient durch Punktion gewonnenes Kapillarblut. Ca. 10 μl Blut werden auf ein Filterpapierplättchen (beispielsweise Papierqualitäten wie 3MM Papier, Fa. Whatman oder Nr. MN 440 oder MN 827, Fa. Macherey & Nagel) von 5 mm Durchmesser gegeben und dort getrocknet. Diese getrockneten Blutproben können über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis zu Wochen sogar bei Temperaturen von 50°C gelagert werden.

Vor einer Elution der Antikörper wird das Filter vorzugsweise für mindestens zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C mit 30 μl PBS/1% BSA rekonstituiert. Das Filterpapier darf hierbei nicht auf einer saugfähigen Unterlage liegen, sondern muß zum Beispiel auf Glas oder Parafilm gelagert sein, um Vermischungen der einzelnen Positionen zu vermeiden. Auf die Auftragsstellen des Objektträgers werden 10 μl PBS/1% BSA gegeben. Anschließend wird jedes Filter direkt auf eine Auftragsstelle gelegt und mit 20 μl PBS/BSA überschichtet. Die Elution/Bindung der Antikörper erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C in 30 Minuten. Anschließend werden die Objektträger vorzugsweise mit PBS abgespült und für 5 Minuten in PBS, das auf 37°C temperiert ist, gewaschen. Nach kurzem Abspülen der Objektträger mit Aqua bidest. werden die Objektträger getrocknet. Nach dem Trocknen der Objektträger werden sämtliche Auftragsstellen mit 10 μl FITC-markiertem Sekundäntikörper beschichtet. Die Objektträger werden für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und dann gewaschen, wie im folgenden Beispiel beschrieben.

Beispiel 2

Nach der Inkubation der Probe mit Sekundäntikörpern (siehe Beispiel 1) wird wie folgt verfahren: Die Menge des gebundenen Sekundäntikörpers ist abhängig vom, anti-HIV-Antikörpergehalt der Serumprobe. Nicht gebundene Sekundäntikörper werden durch Waschen entfernt. Zellgebundene Fluoreszenz wird im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Als Reagentien werden benötigt:

Phosphatgepufferte Saline
Rinderserumalbumin
Antikörper-FITC-Konjugat (Fluorescein Isothiocyanat)
Glycerin

Herstellung der Lösungen

- I Phosphatgepufferte Saline:
6 g NaCl, 1,8 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ und 0,27 g KH_2PO_4 in 1 Liter aqua bidest. lösen.
- II Probenpuffer:
0,5 g Rinderserumalbumin in 50 ml Lösung I lösen.
- III Antikörper-FITC-Konjugat:
1 Volumenteil des anti-IgG-Antikörper-FITC-Konjugats mit 40 Volumenteilen Lösung II mischen.
- IV Eindecklösung:
9 Volumenteile Glycerin mit 1 Volumenteil Lösung I mischen.

Zur Probenvorbereitung werden 1 Volumenteil Probandenserum mit 9 Volumenteilen Lösung II gemischt. Der Test wird bei Raumtemperatur, 18 bis 25°C, ausgeführt:

— 10 Mikroliter verdünntes Probandenserum sind auf eine Auftragsstelle, die infizierte Zellen enthält, aufzutropfen. Ebenfalls 10 Mikroliter sind auf die darüberliegende Auftragsstelle, die nicht infizierte Zellen enthält, zu pipettieren. Auf jedem Objektträger sind zwei Positionen für ein Positivserum und ein Negativserum als Kontrollen vorgesehen. Der Objektträger wird in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

— Anschließend wird der Objektträger für 5 Minuten in 50 ml Lösung I gewaschen. Dieser Waschvorgang ist einmal zu wiederholen. Der Objektträger wird sodann an der Luft getrocknet.

— 15 Mikroliter Antikörper-Konjugat (Lösung III) sind auf die Auftragsstellen zu pipettieren. Der Objektträger wird dann in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

— Der Objektträger wird anschließend für 5 Minuten in 50 ml Lösung I gewaschen. Dieser Waschvorgang ist einmal zu wiederholen. Der Objektträger wird sodann an der Luft getrocknet.

— 5 Mikroliter Lösung IV sind auf die Auftragsstellen zu pipettieren und diese mit Deckgläschen abzudecken. Der Objektträger wird im Fluoreszenzmikroskop bei einer Gesamtvergrößerung von 200 × unter Verwendung der Filterkombination für Fluorescein-Isothiocyanat untersucht. Als positiv und damit indikativ für die Präsenz von anti-HIV-Antikörpern werden solche Fluoreszenzercheinungen gewertet, die ringförmig an den infizierten Zellen auftreten.

Wird mit einem Serum eine Fluoreszenzfärbung sowohl an infizierten als auch an nicht infizierten Zellen erhalten, muß davon ausgegangen werden, daß das Serum kreuzreagierende Antikörper enthält, die nicht mit einer HIV-Infektion korrelieren.

Beispiel 3

Sensitivitätsuntersuchung mit seriell verdünntem, HIV-positivem Blut

Zur Bestimmung des Effektes von Sucrose auf die Stabilisierung von Antikörpern in getrocknetem Blut wurden mehrere Proben von HIV-positivem Blut in Verdünnungsreihen auf unbehandelte sowie Sucrose-behandelte Filter gegeben und mit dem Immunfluores-

zenztest auf anti-HIV-Antikörper untersucht. Durch die Untersuchung in Verdünnungsreihen läßt sich der Abbau von Antikörpern in einer Abnahme des Fluoreszenzsignals quantitativ verfolgen.

- Die Blutentnahme von 11 HIV-seropositiven Patienten erfolgte in der Universitätsklinik Düsseldorf (Kalium/EDTA-Blut). Eine Verdünnungsreihe mit Blut eines seronegativen Probanden wurde am nächsten Tag angefertigt: 10 µl HIV-Blut zu 90 µl Blut pipettiert (1 : 10), gemischt, 10 µl hiervon zu 90 µl Blut pipettiert (1 : 100), gemischt, 10 µl hiervon zu 980 µl Blut pipettiert (1 : 1000). Jeweils 20 µl unverdünnten bzw. 1 : 10, 1 : 100 oder 1 : 1000 verdünnten Blutes wurden auf je ein nicht-stabilisiertes und ein Sucrose-stabilisiertes Filter gegeben und über Nacht getrocknet. Nach 7 Tagen wurden die Filter gemäß Protokoll zur Auswertung von Trokenblutstreifen im Immunfluoreszenztest (IF-Test) untersucht.

1. Elution aus Trockenblutfiltern

Stabilisierte Filter:

Patient	unverd.	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
1	+++	++	+	—
2	+++	+++	++	—
3	+++	+++	++	+
4	+++	++	+	—
5	++	+	—	—
6	+++	++	+	—
7	+++	+++	++	—
8	+++	+++	+	—
9	+++	+++	++	+
10	+++	+++	++	—
11	++	+	—	—

Nicht-stabilisierte Filter:

Patient	unverd.	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
1	+++	++	+	—
2	+++	+++	++	—
3	+++	+++	++	+
4	+++	++	+	—
5	++	+	—	—
6	+++	++	+	—
7	+++	+++	++	—
8	+++	+++	+	—
9	+++	+++	++	+
10	+++	+++	++	—
11	++	+	—	—

- Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, besteht bei einer sich unmittelbar an die Blutentnahme anschließenden Probenauswertung kein Unterschied zwischen stabilisierten und nicht-stabilisierten Filtern.

2. Elution aus Trockenblutfiltern nach 7 Tagen Lagerung bei 37°C

Die Filterstreifen wurden nach der ersten Elution an der Luft getrocknet und für 7 Tage bei 37°C gelagert.

Anschließend wurden analog zur ersten Untersuchung dieselben Filterstreifen erneut im HIV-Test untersucht.

Stabilisierte Filter:

Patient	unverd.	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	
1	+++	++	—	—	5
2	+++	+++	++	—	10
3	+++	+++	++	—	
4	+++	++	+	—	
5	++	+	—	—	
6	+++	++	+	—	
7	+++	+++	+	—	15
8	+++	+++	—	—	
9	+++	+++	++	—	
10	+++	+++	+	—	
11	++	+/-	—	—	20

Nicht-stabilisierte Filter:

Patient	unverd.	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	
1	+++	—	—	—	25
2	+++	+++	—	—	
3	+++	+++	+	—	
4	+++	++	—	—	30
5	++	—	—	—	
6	+++	++	—	—	
7	+++	+++	—	—	
8	+++	+++	—	—	
9	+++	+++	+	—	35
10	+++	+++	—	—	
11	++	—	—	—	

Im direkten Vergleich zu Objektträgern aus der ersten Elution zeigte sich nach einer einwöchigen Lagerung der stabilisierten Filter lediglich in der letzten Verdünnungsstufe eine geringe Signalabschwächung. Die nicht-stabilisierten Filter hingegen wiesen nach einer einwöchigen Lagerung einen deutlichen Abfall in der Menge an nachzuweisenden Antikörpern auf.

50

55

60

65

- Leerseite -

3738982

Nummer:
Int. Cl. 4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag

Fig. 1a 22
37 38 982
G 01 N 33/68
17. November 1987
17. November 1988

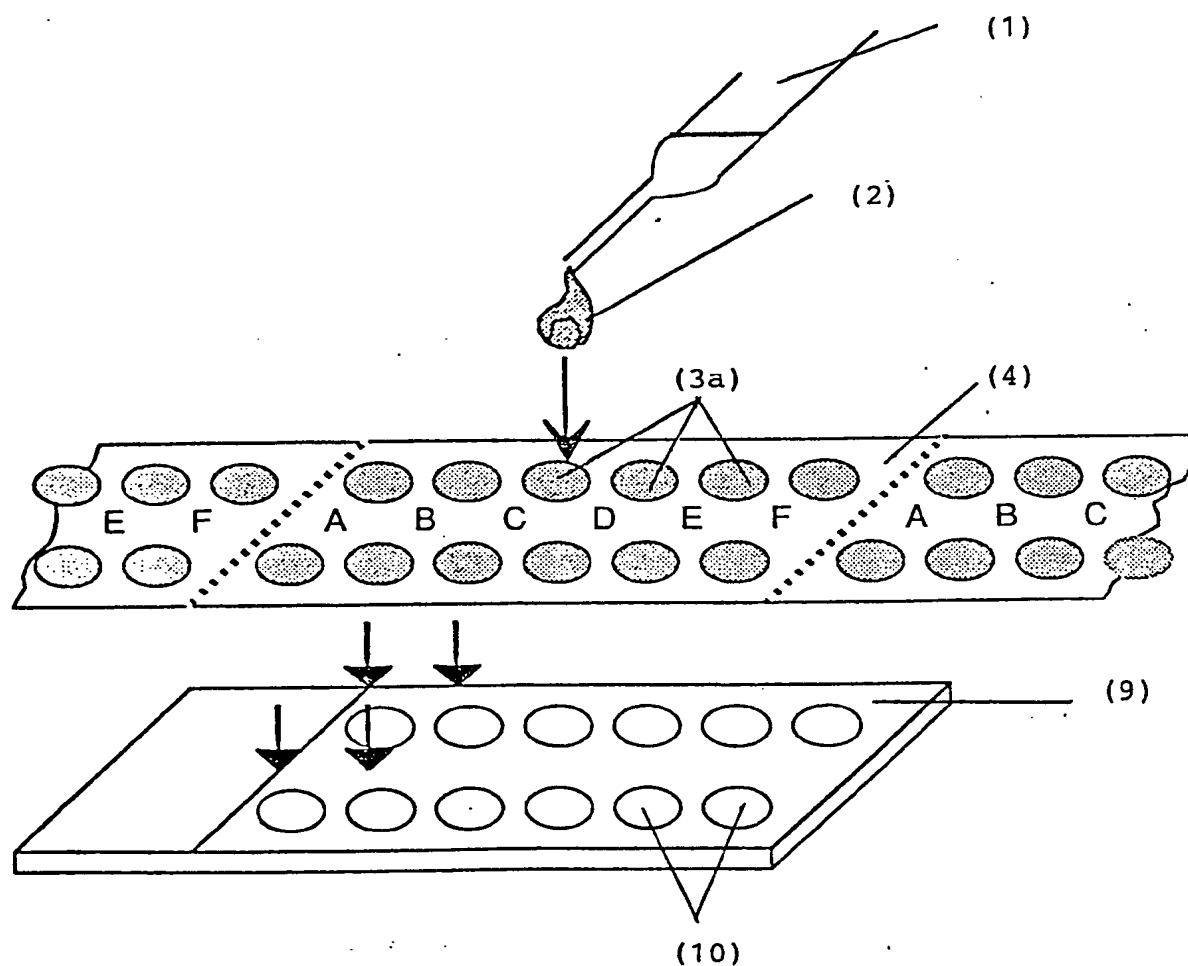


Abb. 1a

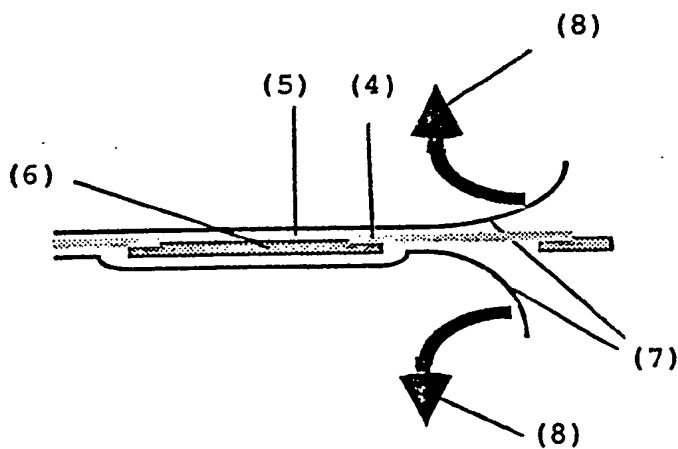


Abb. 1b

ORIGINAL INSPECTED

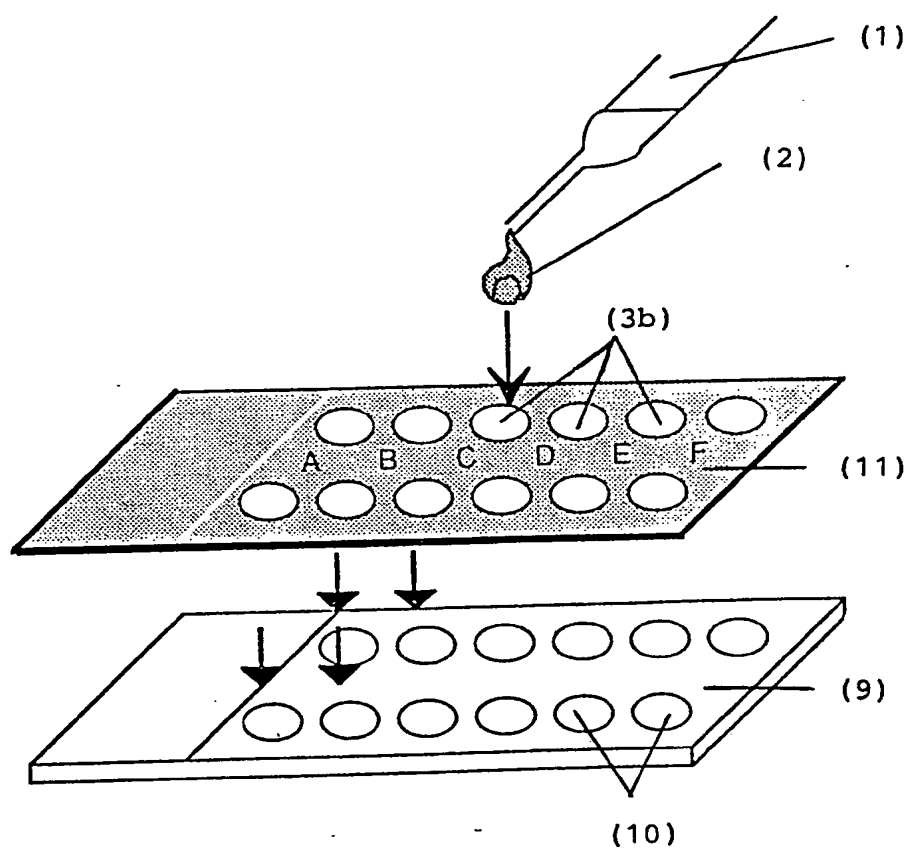


Abb. 2

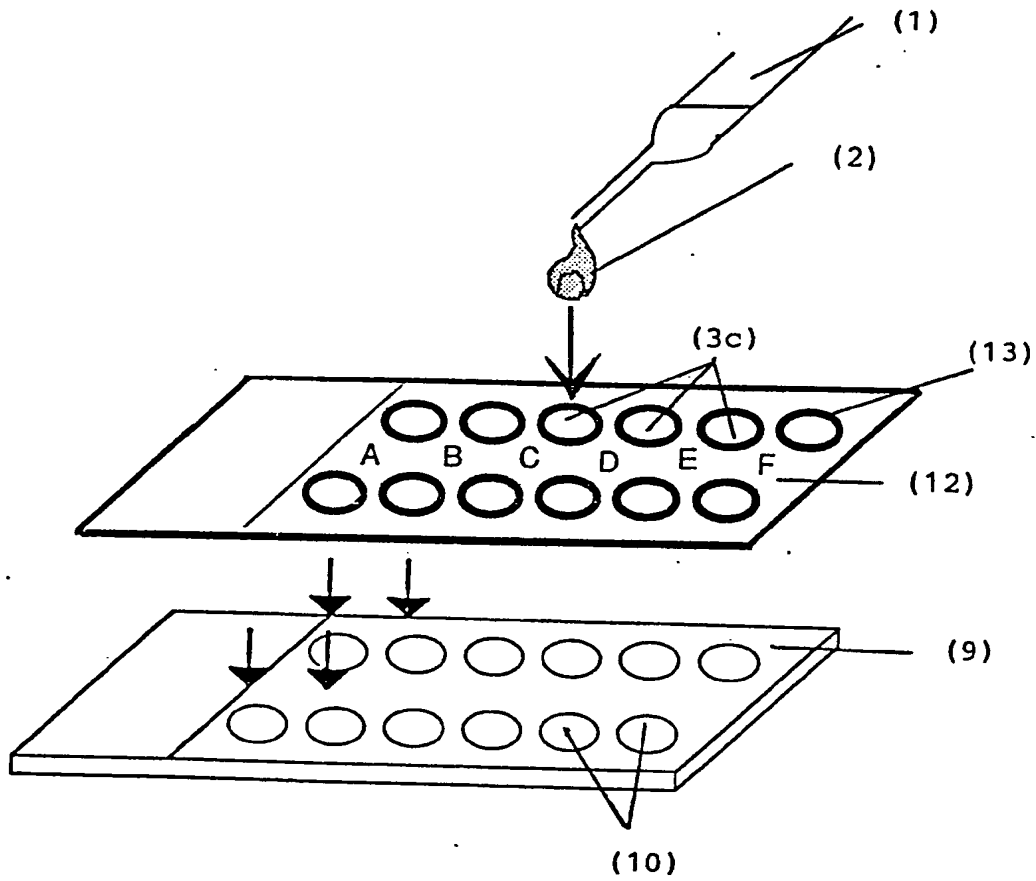


Abb. 3

ORIGINAL INSPECTED

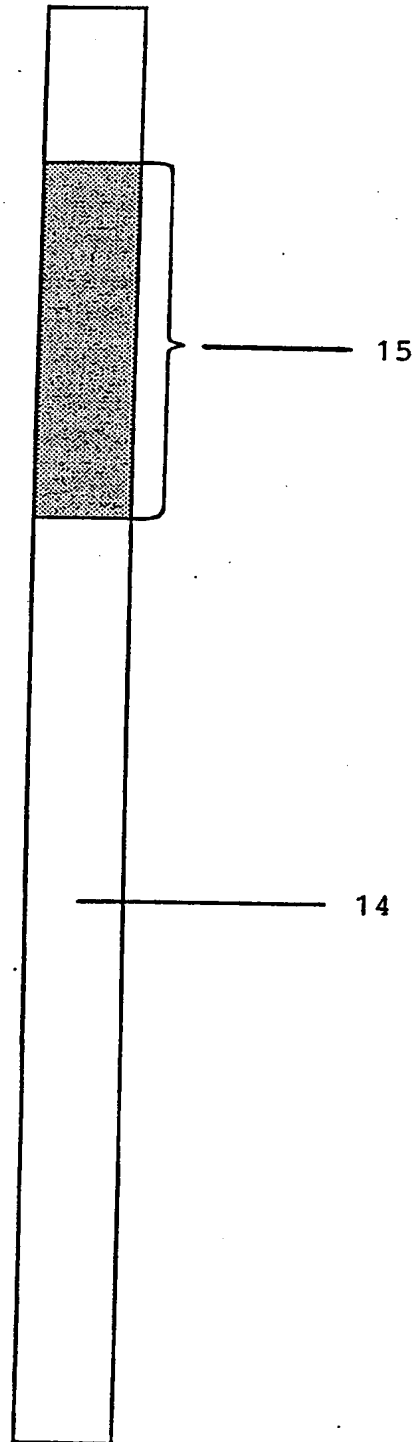


Abb. 4

ORIGINAL INSPECTED

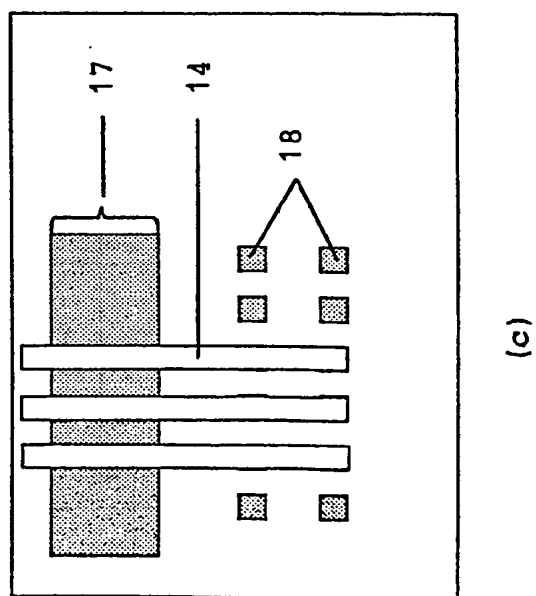
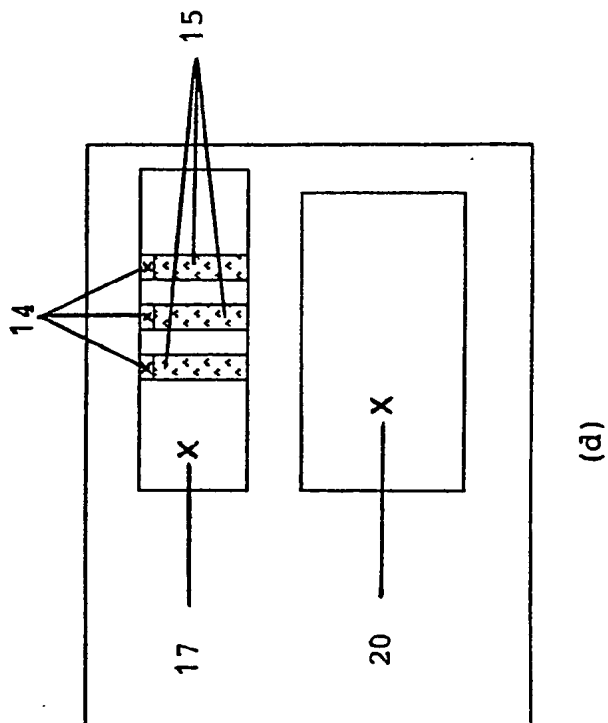
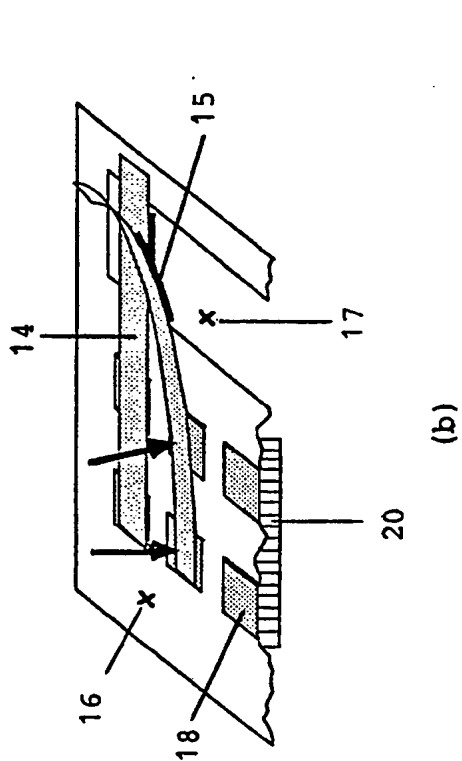
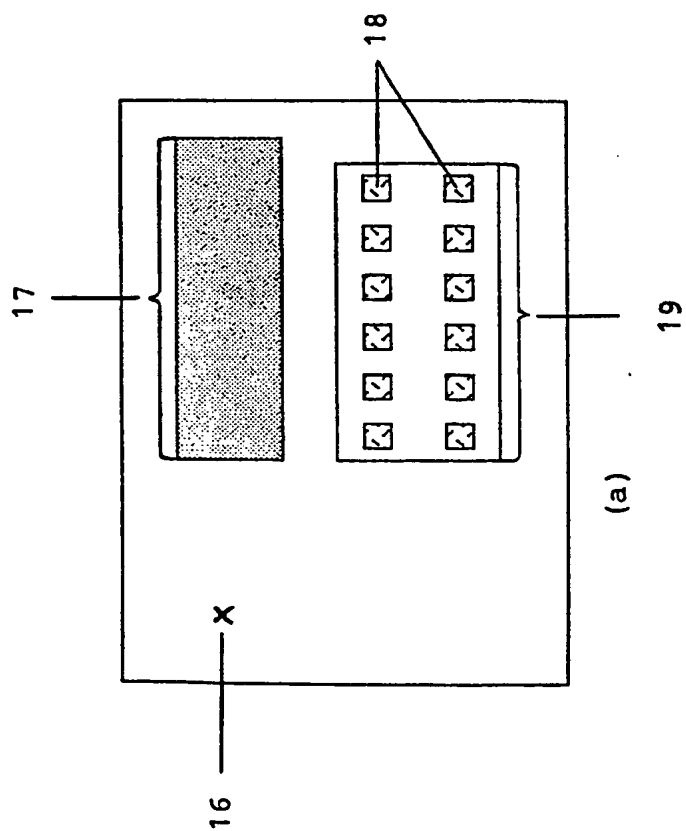


Abb. 5 (a) - (d)

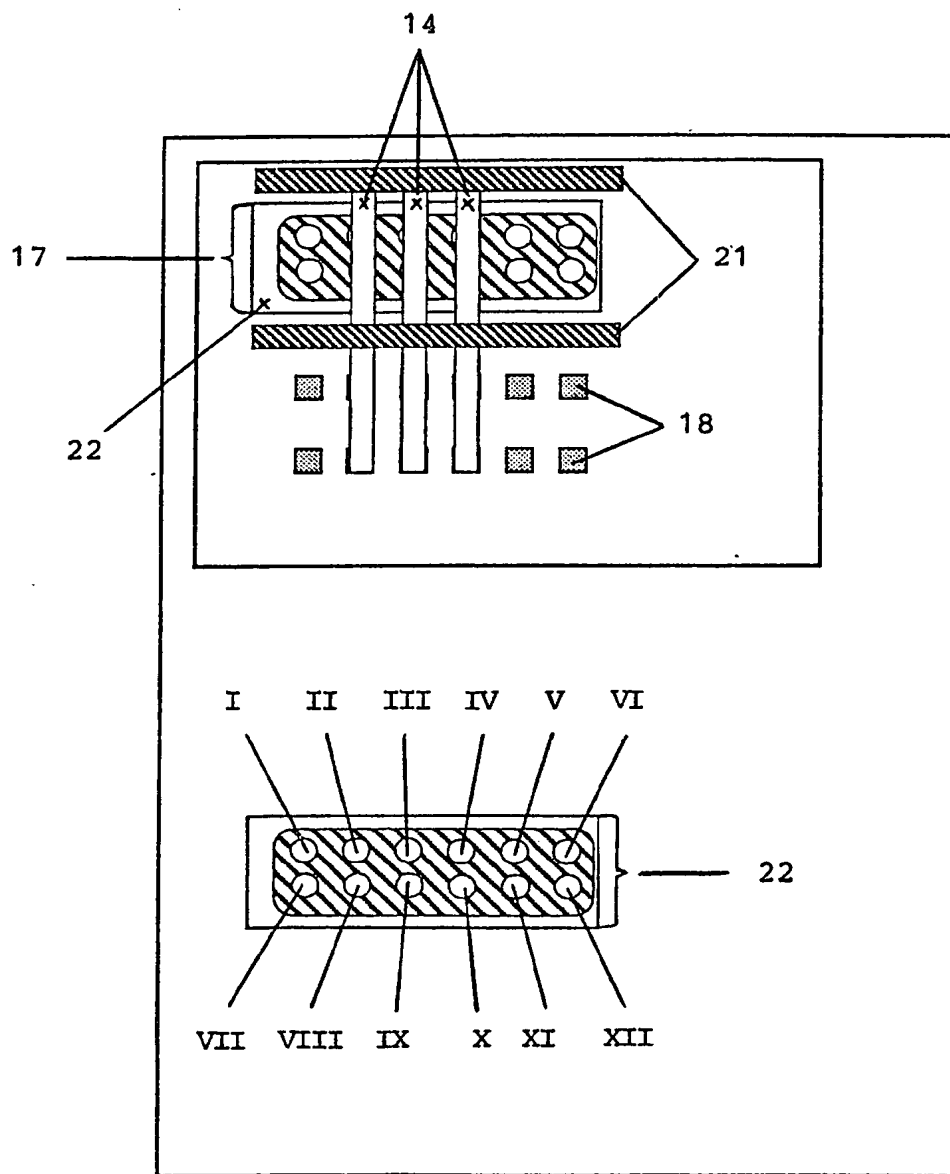


Abb. 5 (e)

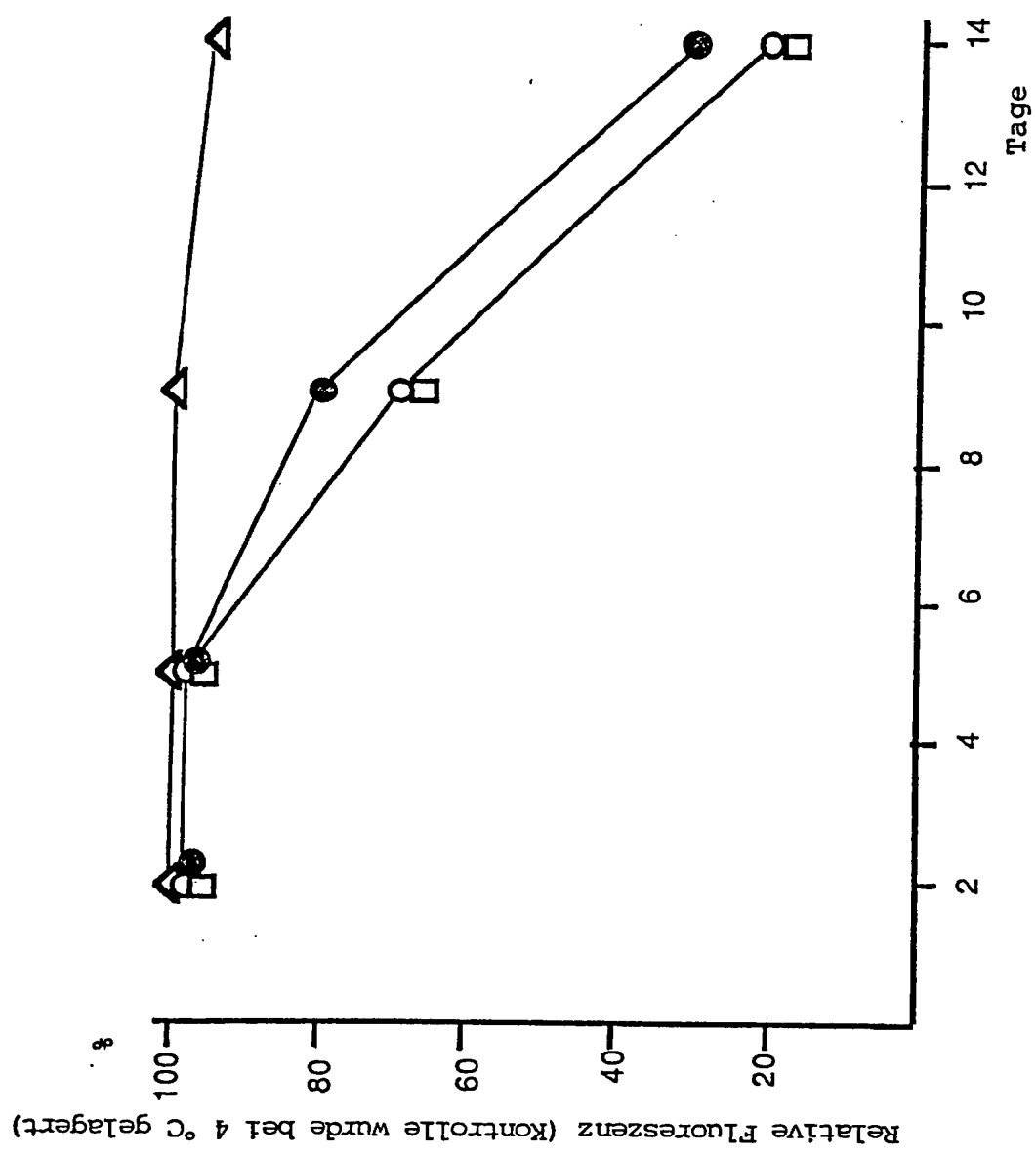


Abb. 6

ORIGINAL INSPECTED